

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/81621 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :	C12Q 1/68	(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP01/03301	
(22) Internationales Anmeldedatum:	23. März 2001 (23.03.2001)	
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch	
(30) Angaben zur Priorität:		
100 19 553.9	20. April 2000 (20.04.2000)	DE
100 49 363.7	5. Oktober 2000 (05.10.2000)	DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Hannover-Langenhangen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEHMEIER, Lutz [DE/DE]; Auf dem grossen Kampe 26, 30900 Wedemark (DE). TAMAK, Cengiz [DE/DE]; Am Gehrkamp 1, 31275 Lehrte (DE). WASCHÜTZA, Stefanie [DE/DE]; Mühlenweg 11, 29227 Celle (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;  
Patentanwälte, Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD, DIAGNOSTIC KIT AND MICROARRAY FOR DETERMINING THE RHESUS FACTOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN, DIAGNOSE-KIT UND MIKROARRAY ZUR BESTIMMUNG DES RHESUS-FAKTORS

**WO 01/81621 A2**

(57) Abstract: The invention relates to a method, a diagnostic kit, a microarray (e.g. DNA chip), and to the use thereof for determining the rhesus factor of a human, in particular, of a human fetus for use, for example, in the field of medicine, particularly in the field of prenatal diagnosis. The inventive diagnostic kit contains at least one pair of oligonucleotides (reverse primers, forward primers), whereby both oligonucleotides of the pair are suitable for use as primers for the amplification by means of polymerase chain reaction of one or both complementary strands of a DNA segment of the human RhD gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray (z.B. DNS-Chip) sowie deren Verwendung zur Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Menschen, insbesondere eines menschlichen Fötus zur Verwendung beispielsweise im Bereich der Medizin, insbesondere in der Pränatal-Diagnose. Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines DNS-Abschnittes des menschlichen RhD-Gens geeignet sind.

Verfahren, Diagnose-Kit und Mikroarray zur Bestimmung  
des Rhesus-Faktors

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Ver-  
fahren, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray (z.B. DNS-  
Chip) sowie deren Verwendung zur Bestimmung des Rhe-  
sus-Faktors eines Menschen, insbesondere eines  
menschlichen Fötus. Derartige Verfahren und Diagnose-  
Kits werden im Bereich der Medizin, insbesondere in  
der Pränatal-Diagnose, verwendet.

Ziel derartiger Pränatal-Diagnosen ist es, den Rhe-  
sus-Faktor eines Menschen, insbesondere eines Fötus,  
zuverlässig zu erfassen.

Der Rhesus-Faktor besitzt große klinische Bedeutung,  
insbesondere für hämolytische Krankheiten von Neuge-  
borenen, Unverträglichkeitsreaktionen bei Transfusio-  
nen und bestimmten hämolytischen Autoimmunkrankhei-  
ten. Die Antigene des Rhesusfaktorsystems werden auf

5 Polypeptiden exprimiert, die durch zwei stark homologe Gene RhD und RhCE exprimiert werden. Das RhD-Antigen legt fest, ob ein Mensch Rhesus-positiv oder Rhesus-negativ ist. Verschiedene RhD-Varianten entstehen aufgrund von Genkonversion zwischen RhD- und RhCE oder durch Mutationen in dem RhD-Gen, die einen Aminosäurenaustausch bewirken.

10 Nach dem Stand der Technik stehen für die Bestimmung des Rhesus-Faktors serologische Verfahren zur Verfügung.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray, ein Verfahren sowie Verwendungen hierfür anzugeben, mit dem eine sichere und zuverlässige Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Menschen möglich ist.

20 Diese Aufgabe wird durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 1, den Mikroarray nach Anspruch 21, das Verfahren nach Anspruch 24 sowie die Verwendung nach Anspruch 42 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Diagnose-Kits, des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Verwendung sind in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

25  
30 Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide, die als Reversprimer und Forwardprimer bei der Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion erforderlich sind. Derartige Oligonukleotid-Paare werden auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt. Die Oligonukleotide dieses Paares sind dabei so ausgesucht, daß bei Einsatz dieser Oligonukleotide in einer Polymerase-Kettenreaktion ein DNS-Abschnitt einer menschlichen DNS amplifiziert wird, der Teil der DNS des menschlichen RhD-Genes ist. Erfolgt eine Amplifikation eines DNS-Abschnittes

35

bei einer derart durchgeföhrten Polymerase-Kettenreaktion, so kann einfach festgestellt werden, ob ein RhD-Gen in der untersuchten DNS-Substanz vorliegt oder nicht. Folglich lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit feststellen, ob der Mensch Rhesus-positiv 5 oder Rhesus-negativ ist.

Vorteilhaft ist es, wenn zur Amplifikation sechs Oligonukleotid-Paare eingesetzt werden bzw. in dem Kit enthalten sind, durch die bei Rhesus-positiven Individuen sechs Amplifikate gebildet werden, während in Rhesus-negativen Individuen keines der Fragmente erzeugt wird. Das erfindungsgemäße Kit und Verfahren erlaubt bei geeigneter Auswahl der Oligonukleotid-Paare weiterhin die Erfassung von Rhesus-Subtypen, die durch den Verlust eines oder mehrerer RhD-Exons zustande kommt (RhD/RhCE-Genkonversion dieser Bereiche) und sich serologisch durch eine schwächere Immunogenität auszeichnen. 10 15

Vorteilhafterweise werden bei den Verfahren eingesetzt bzw. enthält der Kit also mehrere Paare Oligonukleotide, die beispielsweise jeweils einen Abschnitt aus verschiedenen Exons (Kodierteilbereiche) des RhD-Gens amplifizieren. So lassen sich auch verschiedene Untergruppen des Rhesusfaktors erfassen, indem mittels einer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion nicht nur das Vorhandensein des RhD-Gens generell festgestellt wird, sondern auch mögliche Änderungen in einzelnen Exons dieses RhD-Gens. Vorteilhafterweise weisen die Oligonukleotide eines Paares jeweils eine der folgenden Sequenzpaare auf: 20 25 30

TCGGTGCTGATCTCAGTGG und ACTGATGACCATCCTCATGT  
35 bzw.  
CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG

bzw.

GTTGATGTTCTGGCCAAGTT und CACCTTGCTGATCTTACC

bzw.

GTGGCTGGGCTGATCTACG und TGTCTAGTTCTTACCGGCAAGT

5 bzw.

AGCTCCATCATGGGCTACAA und ATTGCCGGCTCCGACGGTATC

bzw.

AACAGGTTGCTCCTAAATATT

und

10 AAACTGGTCATCAAAATATTAACCT

Diese Oligonukleotidpaare führen im Falle des Vorhandenseins der entsprechenden Exons des RhD-Gens zur Amplifikation der Exons 3, 4, 5, 6, 7 bzw. des Exons 15 9 des RhD-Gens. Zur leichteren Unterscheidung der einzelnen Amplifikationsprodukte kann jeweils ein Oligonukleotid eines Primerpaars mittels eines Fluorophors markiert sein, so daß eine Auswertung beispielsweise mittels ABI Genetic Analyzer™ der Firma 20 PE Biosystems™ möglich ist.

Vorteilhafterweise enthält das Diagnose-Kit weiterhin die zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion erforderlichen Substanzen, wie sie bereits von verschiedenen Herstellern angeboten werden.

Die Bestimmung des Vorhandenseins bzw. der allelischen Variabilität des RhD-Gens kann mittels eines Mikroarrays, z.B. DNA-Chips, erfolgen, wobei die einzelnen Zellen des Chips Oligonukleotide aufweisen, die spezifisch mit bestimmten Abschnitten des RhD-Gens, beispielsweise der Exons 3 bis 7 und/oder 9 hybridisieren. Zum Aufbau und der Funktion eines Oligonukleotid-Mikroarrays wird beispielhaft allgemein auf 30 die EP 0 373 203 verwiesen. Die Bestimmung kann dabei 35

mit oder ohne Amplifikation des gesuchten DNS-Abschnitts und ohne oder nach einem geeigneten Restriktionsverdau des gesuchten DNS-Abschnitts erfolgen.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren, der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip und insbesondere das erfindungsgemäße Diagnose-Kit besitzt den großen Vorteil, daß jeder Laborarzt und jedes medizinische Labor sowie jedes wissenschaftliche Labor, das derartige Untersuchungen durchführen möchte, die wesentlichen bzw. sämtliche aufeinander abgestimmte Substanzen gegebenfalls in einem einzigen Diagnose-Kit zur Verfügung erhält, so daß die aufwendigen bzw. jegliche Vorberatungsarbeiten für die Labore entfallen und auf einfache Weise der Rhesus-Faktor eines Menschen, insbesondere eines Fötus, bestimmt werden kann. Insbesondere sind die Primer-Oligonukleotide entwickelt und bereits ausgetestet, so daß die Hauptarbeit bei der Entwicklung entsprechender Amplifikationsprozeduren entfällt. Denn die Auswahl geeigneter Oligonukleotide, die dann in der Praxis auch tatsächlich zu dem gewünschten, sicheren Resultat führen, ist keineswegs trivial und für ein medizinisches oder wissenschaftliches Labor nicht ohne weiteres durchzuführen.

Mit dem vorgestellten Verfahren, dem Mikroarray und Diagnose-Kit ist es insbesondere erstmals möglich, die Bestimmung des Rhesus-Faktors eines Fötus aus dem Blut der Mutter nichtinvasiv in großem Maßstab und am jeweiligen Ort auf einfache und kostengünstige Weise durchzuführen. Denn hierzu benötigt der einzelne Laborarzt bzw. das einzelne medizinische Labor lediglich noch eine Tischzentrifuge, einen herkömmlichen Thermocycler (PCR-Gerät) sowie gegebenenfalls ein Ge-

5 rät zur Auftrennung der einzelnen DNS-Fragmente. Derartige Geräte sind jedoch in vielen medizinischen Labors bereits vorhanden. Dies kann beispielsweise eine Gelelektrophoreseeinheit oder ein Kapillarelektrophoresegerät sein.

10 Ein derartiges herkömmliches Kapillarelektrophoresegerät wird beispielsweise von PE Biosystems™ unter dem Namen PE ABI Genetic Analyzer 310™ vertrieben. Entsprechende Thermocycler für die Amplifikation der DNS werden beispielsweise von der Firma PE Biosystems™ unter dem Namen Gene Amp 2400™ bzw. auch Gene Amp 9700™ vertrieben.

15 5 Erfindungsgemäß kann das Diagnose-Kit auch dahingehend weitergebildet werden, daß dem Diagnose-Kit nicht nur Oligonukleotide für die Bestimmung des Rhesus-Faktors des Fötus, wie oben beschrieben, sondern auch weitere Oligonukleotidpaare für weitere Bestimmungen beigegeben werden. Entsprechend können in weiteren Zellen des Chips entsprechende Oligonukleotide angeordnet sein, die mit DNS-Abschnitten weiterer, zu erfassender Gene hybridisieren.

20 25 In diesem Falle ist es dem Anwender möglich, auf einfache Art und Weise nicht nur eine Bestimmung des Rhesusfaktors des Fötus, sondern zugleich auch weitere molekularbiologische Tests durchzuführen.

25 30 35 Erfindungsgemäß wird das Verfahren, der Mikroarray und das Diagnose-Kit zur Bestimmung des fötalen Rhesus-Faktors verwendet, indem zuerst eine maternale Blutprobe genommen wird. Diese maternale Blutprobe kann nun auf verschiedene Weise weiterverarbeitet werden.

- Zum einen werden die DNS-haltigen Bestandteile der maternalen Blutprobe anschließend aufkonzentriert. Dies erfolgt beispielsweise durch Blutsatz, gegebenenfalls unterstützt durch Anzentrifugation zur Beschleunigung der Sedimentation der zellulären Bestandteile. Durch diesen Schritt konzentriert sich die Zellfraktion in einem Blutsatz, der sich für die nachfolgende DNS-Isolierung eignet.
- Der Blutsatz wird aufgenommen und eine Lyse der mütterlichen Erythrozyten sowie der nukleierten fötalen Erythrozyten durchgeführt, wodurch die DNS aus den fötalen Erythrozyten freigesetzt wird.
- Anschließend erfolgt eine hochtourige Zentrifugation, beispielsweise bei 50.000 g für 30 Minuten, die zu einer Pelletierung von Zellen der Mutter und des Fötus (z.B. Lymphozyten), der aus den fötalen Erythrozyten freigesetzten DNS des Fötus sowie zellfreier DNS vom Fötus mit Herkunft aus diversen Zelltypen, führt.
- Daraufhin wird das Pellet aufgenommen und es erfolgt eine Lyse der Lymphozyten sowohl mütterlicher als auch fötaler Herkunft. Nach Proteinfällung werden die Proteine abzentrifugiert. Im Überstand befindet sich dann freie DNS der Mutter und des Fötus. Diese wird mit Isopropanol gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das Pellet enthält dann die DNS von Mutter und Fötus und wird anschließend rehydriert.
- Zum anderen kann für die Gewinnung der nachzuweisenden DNS auch das Plasma/Serum der maternalen Blutprobe verwendet werden. Hierfür wird gegebenenfalls zuerst mittels Blutsatz die Zellfraktion der Mutter und des Fötus in der Blutprobe absinken lassen oder durch

anzentrifugieren abgetrennt. Der Überstand enthält dann zellfreie DNS, insbesondere zellfreie fötale DNS. Diese zellfreie DNS aus dem Plasma/Serum kann nun direkt abgetrennt werden. Bei diesem Verfahren 5 wird der Anreicherungsschritt für die Zellen aus der ersten Variante vermieden. Denn eine Anreicherung oder Trennung der im Plasma/Serum enthaltenen DNS von Mutter und Fötus ist nicht erforderlich, da in dem 10 Plasma/Serum etwa 800 mal mehr fötale DNS vorhanden ist als fötale DNS aus fotalen Zellen, die im mütterlichen Blut zirkulieren. Der Anteil der fotalen DNS an der gesamten im Plasma enthaltenen DNS liegt zwischen ca. 3 % und 7 %. Insgesamt nimmt dabei die 15 zellfreie fötale DNS im Laufe der Schwangerschaft stetig zu, im letzten Trimester der Schwangerschaft sogar sehr stark.

In einem weiteren Schritt kann dann diese zellfreie 20 fötale DNS aus dem Plasma/Serum in herkömmlicher Weise, beispielsweise mit kommerziell erhältlichem Kit, isoliert werden und ist damit für die weitere Untersuchung, z.B. durch Auftrag auf den erfindungsgemäßen Mikroarray, zugänglich.

Sowohl die DNS, die aus den fotalen nukleierten Zellen 25 aus der maternalen Blutprobe als auch die DNS, die aus dem Serum/Plasma der maternalen Blutprobe gewonnen wurde, wird gegebenenfalls anschließend weiterverarbeitet, indem eine spezifische Amplifikation 30 der nachzuweisenden DNS-Abschnitte in der in dem Pellet enthaltenen DNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. Multiplex-PCR durchgeführt wird. Hierzu werden nun das erfindungsgemäße Diagnose-Kit bzw. die darin enthaltenen Primer-Paare verwendet.

35 Anschließend wird die amplifizierte DNS nachgewiesen.

Dies kann einerseits mittels des erfindungsgemäßen Mikroarrays oder durch Auftrennen über Gelelektrophorese erfolgen. Sofern eines der Oligonukleotide aus einem Primer-Paar mit einem Fluorophor markiert ist, kann der Nachweis über die Detektion der entsprechenden Fluoreszenz, beispielsweise in der entsprechenden Zelle des Chips, erfolgen. Dies kann beispielsweise jedoch auch mittels einer Genetic Analyzers 310<sup>TM</sup> der Firma PE Biosystems<sup>TM</sup> erfolgen. Beide Verfahren weisen eine sehr hohe Sensitivität und Zuverlässigkeit auf.

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten werden ausgewertet und als Nachweis für den Rhesus-Faktor des Fötus eingesetzt.

Bei dem vorliegenden Verfahren ist dabei zu beachten, daß keine Trennung der Bestandteile der maternalen Blutprobe beispielsweise in eine zelluläre oder nichtzelluläre Fraktion oder beispielsweise in eine Fraktion mit ausschließlich maternalen bzw. ausschließlich fotalen Bestandteilen durchgeführt wird. Das Verfahren ist daher sehr einfach durchzuführen.

Der Fall, bei dem sowohl die Mutter als auch der Fötus Rhesus-positiv oder die Mutter als auch der Fötus Rhesus-negativ sind, weist medizinisch keinerlei Komplikationen auf. Dasselbe gilt für den Fall, daß die Mutter Rhesus-positiv ist und der Fötus Rhesus-negativ. Auch in diesem Falle treten keinerlei medizinische Komplikationen auf.

Kritisch ist lediglich der Fall, wenn die Mutter Rhesus-negativ und der Fötus Rhesus-positiv sind. In diesem Falle ist die Gefahr gegeben, daß die Mutter gegen den Rhesus-Faktor des Fötus Antikörper bildet

und beispielsweise bei nachfolgenden Schwangerschaften und in sehr seltenen Fällen bereits in der laufenden Schwangerschaft Immunreaktionen auftreten. Genau dieser Fall kann jedoch durch das vorliegende  
5 Verfahren einfach erfaßt werden, da ein Rhesus-positiver Befund der wie oben aufgearbeiteten Blutprobe im Falle einer Rhesus-negativen Mutter, deren Rhesusfaktor in herkömmlicher Weise, spätestens zu Beginn der Schwangerschaft, serologisch bestimmt wurde,  
10 eindeutig auf einen Rhesus-positiven Fötus schließen läßt. Wird in diesem Falle beispielsweise eine Fluoreszenz erfaßt, die von einem Oligonukleotid herrührt, das zu einem Primerpaar gehört, das zur Amplifikation eines DNS-Abschnittes aus einem RhD-Gen geeignet ist, so liegt zwangsläufig bei dem Fötus ein  
15 Rhesus-positiver Befund vor, da gemäß der Annahme die mütterlichen Bestandteile selbst kein RhD-Gen aufweisen. In diesem Falle kann die herkömmliche Prophylaxe erfolgen. Im Falle einer Rhesus-negativen Mutter erfolgt bisher immer eine Prophylaxe, obwohl sie nur  
20 bei einem Rhesus-positiven Fötus erforderlich ist. Wird also mit dem erfindungsgemäßen Kit ein Rhesus-negativer Fötus festgestellt, so kann nunmehr die bisher übliche Prophylaxe bei der Mutter unterbleiben.  
25

Das erfindungsgemäße Verfahren, das erfindungsgemäße Diagnose-Kit und seine Verwendung sind also dafür geeignet, den einzige medizinisch relevanten Fall gesichert und auf einfache Weise nachzuweisen.  
30

Weiterhin ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und Kit möglich, Rhesus-Subtypen, die durch den Verlust eines oder mehrerer RhD-Exons zustande kommen  
35 (RhD/RhCE-Gen-Konversion dieser Bereiche) und sich serologisch durch eine schwächere Immunogenität aus-

zeichnen, nachzuweisen.

5 Im folgenden sollen einige Beispiele des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung erfindungsgemäßer Kits beschrieben werden.

10 Figur 1 zeigt die Meßergebnisse einer Rhesus-positiven Kontrollprobe;

Figur 2 die Ergebnisse einer Rhesus-negativen Kontrollprobe

und

.5 Figur 3 die Ergebnisse einer Multiplex-PCR.

Als Beispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens wurde einer Schwangeren eine frische Blutprobe entnommen und in EDTA-Puffer, beispielsweise in standardisiert, kommerziell verfügbaren EDTA-Röhrchen aufgenommen.  
20 Anschließend wurden 5 bis 10 ml des mütterlichen Blutes für 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das Plasma wird vorsichtig von den pelletierten Blutbestandteilen getrennt und erneut für 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend in ein neues Gefäß überführt. Die kernfreie fötale DNS verbleibt bei dieser Prozedur im Plasma. Die DNS wird dann durch die Standardprozeduren des QIAamp Blood Kits™ (Firma Qiagen, Hilden) isoliert und kann  
25 für die Bestimmung des Rhesus-Faktors mit einem Primerpaar (Single PCR) oder mit mehreren Primerpaaren gleichzeitig (Rhesus-Faktor-Multiplex-PCR) im folgenden eingesetzt werden.

35 Die Anreicherung kann in einem weiteren Beispiel auch durch eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

erfolgen.

Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, daß bei einer konstanten Zentrifugalkraft und Mediumviskosität die 5 Sedimentationsrate von Partikeln proportional zur Größe der Partikel ist. In dem vorliegenden Beispiel wurde Percoll™ als Zentrifugationsmedium verwendet. Es handelt sich dabei um ein Silika-Derivat, das standardmäßig zur Anreicherung bzw. Trennung von sub- 10 zellulären Partikeln verwendet wird.

Zunächst wird ein kontinuierlicher Percoll-Gradient erzeugt, der einen Dichtebereich von 1,02-1,113 g/ml abdeckt. Hierzu wurden 14 ml einer Percoll-NaCl- 5 Lösung mit einer Dichte von 1,07 g/ml bei 30 Minuten und 20.000 g zentrifugiert. Anschließend wird dieser kontinuierliche Gradient mit 10 ml mütterlichem Blut überschichtet und für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. 15

Nach diesem Zentrifugationsschritt finden sich die 20 mütterlichen Thrombozyten in der Serumschicht oberhalb des Gradienten und werden mit einer Pasteuerpipette entfernt und verworfen. In einem weiteren Zentri- 25 trifugationsschritt bei 1000 g über 5 Minuten werden die verbliebenen, unterschiedlichen Blutzellentypen entsprechend ihrer jeweiligen Dichten aufgetrennt. Die Sedimentationsschicht mit den fötalen mononuklearen Erythrozyten findet sich als Bande bei einer 30 Dichte von 1,09 - 1,10 g/ml und kann mit einer Pa- steurpipette entnommen werden. Sie wird daraufhin dreimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH = 7,4) gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die DNS der mononuklearen Blutzellen wird dann durch die Stan- 35 dardprozeduren des QIAamp Blood Kits™ (Firma Qiagen, Hilden) isoliert und anschließend für die nachfolgen-

de Single-PCR oder Rhesus-Faktor-Multiplex-PCR eingesetzt.

Als ein weiteres Beispiel für eine Probenaufbereitung wird eine Blutprobe einer Schwangeren entnommen und in EDTA-Puffer, wie vorstehend ausgeführt, aufgenommen. Anschließend wird über Nacht ein Blutsatz durchgeführt. Alternativ kann die Probe auch bei geringen g-Werten anzentrifugiert werden. Von diesem Blutsatz werden 500 µl in 900 µl Erythrozyten-Lysis-Puffer des Wizzard™-Kits der Firma Promega™ aufgenommen. Daraufhin wurde in einer Sorvall™-Zentrifuge (Rotor SM 24) für 30 Minuten bei 50.000 g zentrifugiert. Hierdurch werden die vorwiegend maternalen Lymphozyten sowie die nach der Lysis der kindlichen Erythrozyten zellfrei vorliegende DNS pelletiert. Aus dem Pellet wird nun mittels eines herkömmlichen kommerziellen DNS-Isolierungs-Kit (z.B. Wizzard-Kit™ der Firma Promega™) die DNS isoliert. Die gewonnene DNS wird in 20 µl der Dehydrierungslösung gemäß den jeweiligen DNS-Isolierungs-Kit aufgenommen.

Die Isolierung fötaler kernhaltiger Erythrozyten ist weiterhin mittels FACS-Durchflußcytometrie möglich. Hierzu erfolgt zunächst eine Anreicherung aller mononuklearer Blutzellen mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe oben). Die Sedimentationsschicht mit mononuklearen Blutzellen wird dabei mit einer Pasteurpipette entnommen, dreimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH = 7,4) gewaschen und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert.

Im Anschluß an die Dichtegradienten-Zentrifugation werden 800 µl der erhaltenen Blutzellsuspension für 60 min bei 4 °C mit einem Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen das GlycophorinA-Ober-

flächenprotein (BD-PharMingen) und einem Fluorescein-Isothiocyanat (T9-FITC)-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor (CD36) (BD-PharMingen) inkubiert bzw. markiert. Ein dritter Fluoreszenz Kanal wird benutzt für die negative Diskriminierung von T, B und NK Zellen. Die Endkonzentration beider Antikörper beträgt jeweils 0,2 µg pro 10<sup>7</sup> Zellen. Die markierten Zellen werden zweimal PBS gewaschen und im Anschluß werden 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml PBS resuspendiert.

Für die Isolierung kernhaltiger Erythrozyten wird ein FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton-Dickinson) verwendet. Das System ist mit einem wassergekühlten dual Wellenlänge Argon-Laser (Emissionswellenlänge 488 nm und 365 nm-UV) und ein luftgekühlter Helium-Neon (HeNe) Laser konfiguriert und mit fluoreszierenden Beads (Becton Dickinson) kalibriert. Das Cell-Quest Programm wird verwendet für die Datenaufnahme, Instrumentkontrolle sowie die statistische Auswertung. Die Sortierung der Blutzellen erfolgt mit Zellraten von 20.000 - 25.000 Zellen pro Sekunde, wobei die Zellgröße ("forward scatter"), und die Granularität, sowie die Oberflächenstruktur ("side scatter"), die Emission der grünen Fluoreszenz (Transferrin-Rezeptor, T9-FITC), die Emission der orangen Fluoreszenz (GlycophorinA, KC16-Rd) sowie die Emission der roten Fluoreszenz für die übrigen Parameter, wie CD45, CD3, CD19 und CD16/56 (APC oder Cy5 markiert), als Selektionskriterien verwendet werden. Um eine zusätzliche Diskriminierung von kernhaltigen Zellen zu gewährleisten wird der Kernfarbstoff Hoechst 33342 verwendet. Die Anregung erfolgt gleichzeitig mit der UV-Linie des Enterprise Lasers. Die sortierten Zellen werden direkt in 1,5 ml Reaktionsgefäß, das mit 1 ml PBS gefüllt ist, überführt und können bei -20 °C ge-

lagert werden.

Zwar wird bei dem vorgeschlagenen Verfahren die fötale DNS nicht vollständig von der mütterlichen DNS getrennt. Sofern jedoch die Mutter Rhesus-negativ ist, weist ein positiver RhD-Nachweis jedoch immer auf einen Rhesus-positiven Fötus hin. Im Anschluß an die Isolierung der DNS wird eine Multiplex-PCR durchgeführt.

10

Hierzu wurden die folgenden Primer verwendet, wobei jeweils ein Primer aus einem Primerpaar mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die entsprechenden Primer werden in der folgenden Tabelle gegeben.

.5

Primername	Sequenz	Markierung	Größe
PRHE31F (Exon3)	5'-TCGGTGCTGATCTCAGTGGAA-3'	5'-NED	108 bp
PRHE31R (Exon3)	5'-ACTGATGACCATCCTCATGT-3'	-	
PRHE41F (Exon4)	5'-CACATGAACATGATGCACA-3'	5'-HEX	120 bp
PRHE41R (Exon4)	5'-CAAACCTGGGTATCGTTGCTG-3'	-	
PRHE51F (Exon5)	5'-GTGGATGTTCTGCCAAGTT-3'	5'-6-FAM	153 bp
PRHE51R (Exon5)	5'-CACCTTGCTGATCTTACC-3'	-	
PRHE61F (Exon6)	5'-GTGGCTGGGCTGATCTACG-3'	5'-NED	52 bp
PRHE61R (Exon6)	5'-TGTCTAGTTCTTACCGGCAAGT-3'	-	
PRHE71F (Exon7)	5'-AGCTCCATCATGGGCTACAA-3'	5'-6-FAM	91 bp
PRHE71R (Exon7)	5'-ATTGCCGGCTCCGACGGTATC-3'	-	
PRHE91F (Exon9)	5'-AACAGGTTGCTCCTAAATATT-3'	5'-HEX	72 bp
PRHE91R (Exon9)	5'-AAACTTGGTCATAAAAATTTAACCT-3'	-	

20

Tabelle 1

5 In der ersten Spalte der Tabelle ist dabei der Name des Primers angegeben. Weiterhin ist dort die Lokalisierung des zu amplifizierenden DNS-Abschnittes angegeben (Exon 3 bis 7, 9). In der zweiten Spalte der Tabelle ist die entsprechende Primersequenz angegeben, in der dritten Spalte der Fluoreszenzfarbstoff, mit dem der jeweilige Primer markiert ist. Dabei  
10 steht die Bezeichnung 5'-NED für das Fluorophor NED™ der Firma PE Biosystems, die Bezeichnung 5'-HEX für den Farbstoff 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein und die Bezeichnung 5'-6-FAM für den Farbstoff Carboxyfluorescein.

15 20 25 In der letzten Spalte ist die Größe des Amplifikationsproduktes angegeben, das bei einer PCR mit dem jeweiligen Primerpaar entsteht. Wie zu erkennen ist, ergeben sich zwei verschiedene Gruppen von Amplifikationsprodukten mit Längen zwischen 52 und 91 Basenpaaren bzw. Längen zwischen 108 und 153 Basenpaaren. Da diese ausreichend weit voneinander entfernt liegen, kann in jeder der Gruppe einer der Farbstoffe wieder verwendet werden und dennoch eine zuverlässige Unterscheidung der einzelnen Amplifikationsprodukte erzielt werden.

30 Die PCR-Reaktionen wurden im vorliegenden Beispiel mit einem PCR-Blockcycler PE 9700 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Als Reaktionsansatz wurde dabei die folgende Mischung verwendet, wobei als Reaktionsvolumen jeweils 100 µl eingesetzt wurden:

	Volumen	Endkonz.
gDNS-Template	10 µl	100 ng
Taq-Puffer	10 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	6 µl	1,5 mM
Nukleotide	2 µl	200 µM
Primer a	1 µl	0,12 µM
Primer b	1 µl	0,12 µM
H <sub>2</sub> O	69,5 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	2 U

5 Die PCR wurde dabei mit dem folgenden Thermozyklus durchgeführt:

94 °C	5 min
94 °C	1 min
55 °C	1 min (35 Zyklen)
72 °C	45 sec
72 °C	5 min

10 Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels ABI-  
Fragmentanalyse wurden die einzelnen PCR-Ansätze zu-  
nächst unverdünnt eingesetzt, wobei für die einzelne  
Analyse jeweils 1 µl verwendet wurde.

15 Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Figuren 1 und 2  
dargestellt. Figur 1 zeigt die Ergebnisse der PCR an  
einer serologisch für Rhesus-positiv bestimmten Blut-  
probe mit jeweils verschiedenen Primerpaaren gemäß  
Tabelle 1. Es ist zu erkennen, daß in den Figuren 1A  
bis 1F jeweils eine starke Fluoreszenz von Amplifika-  
tionsprodukten mit 108 Basenpaaren, 120 Basenpaa-  
ren, 153 Basenpaaren, 52 Basenpaaren, 91 Basenpaaren  
bzw. 72 Basenpaaren Länge beobachtet wurden.

5

Die Signale im Bereich unterhalb von 40 Basenpaaren (s. insbesondere Figur 1C) stammen vermutlich von unspezifischen Amplifikaten und beeinträchtigen das erfundungsgemäße Verfahren nicht.

10

Figur 2 zeigt die Ergebnisse einer PCR mit einer serologisch als Rhesus-negativ bestimmten Blutprobe mit jeweils verschiedenen Primerpaaren gemäß Tabelle 1.

.5

Es ist unmittelbar aus den Figuren 1A bis 1F zu erkennen, daß in dieser Blutprobe keine nennenswerten Mengen von Amplifikationsprodukten mit den zu erwartenden Längen erfaßt werden konnten. Der serologische Befund wird folglich durch das erfundungsgemäße Verfahren vollständig bestätigt.

20

Figur 3 zeigt die Ergebnisse einer Multiplex-PCR, bei der sämtliche Primerpaare gemäß Tabelle 1 gleichzeitig eingesetzt wurden. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden auf einem PCR-Blockcycler PE 9700 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

25

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz bei einem Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet:

	Volumen	Endkonz.
gDNS-Template	2 µl	100 ng
Taq-Puffer	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	1,5 mM
Nukleotide	1 µl	200 µM
Primer 31F	0,25 µl	0,05 µM
Primer 31R	0,25 µl	0,05 µM
Primer 41F	0,5 µl	0,1 µM
Primer 41R	0,5 µl	0,1 µM

Primer 51F	1,5 µl	0,3 µM
Primer 51R	1,5 µl	0,3 µM
Primer 61F	0,25 µl	0,05 µM
Primer 61R	0,25 µl	0,05 µM
Primer 71F	0,5 µl	0,1 µM
Primer 71R	0,5 µl	0,1 µM
Primer 91F	1,5 µl	0,3 µM
Primer 91R	1,5 µl	0,3 µM
H <sub>2</sub> O	38,5 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U

Die PCR-Zyklen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

5

95 °C	15 min
94 °C	1 min
55 °C	1 min (35 Zyklen)
72 °C	45 sec
72 °C	10 min

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden zunächst unverdünnt eingesetzt, wobei für die Fragment-Analyse jeweils 1 µl verwendet wurde.

10

Figur 3 zeigt die Ergebnisse zweier Messungen, wobei in Figur 3A als PCR-Template zunächst Rhesus-positives Kontrollblut, wie es durch serologische Standardverfahren typisiert wurde, eingesetzt wurde.

15

In Figur 3B sind die Ergebnisse einer PCR mit einem PCR-Template aus Rhesus-negativem Kontrollblut zu sehen. Abweichend von den vorigen Messungen wurde in beiden Fällen das Albumin-Gen als Standard hinzugefügt sowie die folgenden Primer:

20

Albumin fw: GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C

sowie

Albumin rv: GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC

5

Der Vorwärtsprimer ("Albumin fw") ist dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5'-Ned™ markiert.

10 Hierdurch ergab sich eine Bande bei 350 Basenpaaren für die Amplifikationsprodukte des Albumin-Gens.

.5

In Figur 3A sind weiterhin die jeweiligen Signale für die Amplifikationsprodukte sämtlicher 6 Primerpaare aus Tabelle 1 zu erkennen. Offensichtlich handelte es sich also um ein Rhesus-positives Blut, das hier untersucht wurde.

20

In Figur 3B ist zu erkennen, daß in einer entsprechenden Rhesus-negativen Kontrollprobe keinerlei Fluoreszenzbanden mit Ausnahme der Albuminbande bei 350 Basenpaaren beobachtet wurde. Das erfindungsgemäße Kit, der erfindungsgemäße Mikroarray und das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich also auch mit Multiplex-PCR zur Unterscheidung zwischen Rhesus-negativem und Rhesus-positivem Blut sowie zur Bestimmung einzelner Subtypen.

25

Patentansprüche

1. Diagnose-Kit für die Bestimmung des Rhesus-Faktors mit

5 mindestens einem Paar Oligonukleotide (Reverse-primer, Forwardprimer),

0 wobei die beiden Oligonukleotide des Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und

15 wobei der gesuchte DNS-Abschnitt Teil der DNS des menschlichen RhD-Gens ist.

2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es sechs Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält,

20 wobei die beiden Oligonukleotide der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge verschiedener gesuchter DNS-Abschnitte geeignet sind, und

25 wobei die gesuchten DNS-Abschnitt Teil der DNS des menschlichen RhD-Gens sind.

3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die gesuchten DNS-Abschnitte Teil von Kodier teilbereichen des RhD-Gens sind.

5

4. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß je einer der gesuchten DNS-Abschnitte Teil der Kodier teilbereiche 3, 4, 5, 6, 7 oder 9 sind.

0

5. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.

15

6. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate, sowie eine hitzestabile Polymerase enthält.

20

7. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) enthält.

25

8. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Po-

sitivkontrolle eine DNS-Probe mit dem jeweils gesuchten DNS-Abschnitt enthält.

9. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin für eine Kontrollbestimmung einen Abschnitt einer für ein Albumin kodierenden DNS sowie zwei Oligonukleotide, die jeweils als Primer zur Amplifikation zumindest eines Abschnitts jeweils eines der beiden komplementären Stränge der für das Albumin kodierenden DNS geeignet sind, enthält.  
5
10. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide eines Paars von Oligonukleotiden mit Fluorophoren markiert ist.  
15
11. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide verschiedener Paare mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind.  
20
12. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Oligonukleotide eines Paars paarweise die folgenden Sequenzen aufweisen:  
25

TCGGTGCTGATCTCAGTGGA und ACTGATGACCATCCTCATGT  
bzw.

CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG  
bzw.

5 GTGGATGTTCTGGCCAAGTT und CACCTGCTGATCTTACC  
bzw.

GTGGCTGGGCTGATCTACG und TGTCTAGTTCTTACCGGCAAGT  
bzw.

.0 AGCTCCATCATGGGCTACAA und ATTGCCGGCTCCGACGGTATC  
bzw.

AACAGGTTTGCTCCTAAATATT und AACACTGGTCATCAAAA-  
TATTTAACCT

13. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
15 dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
mit folgender Sequenz  
GTGGATGTTCTGGCCAAGTT bzw. AGCTCCATCATGGGCTACAA  
mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert  
sind.

20 14. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
mit der Sequenz  
CACATGAACATGATGCACA bzw. AACAGGTTTGCTCCTAAATATT  
25 mit dem Fluorophor 4',7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-  
Carboxyfluorescein markiert sind.

30 15. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide  
mit der Sequenz

TCGGTGCTGATCTCAGTGGA bzw. GTGGCTGGGCTGATCTACG mit dem Fluorophor NED™ der Fa. PE Biosystems markiert sind.

- 5        16. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Anleitung zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und/oder eine Anleitung zur Durchführung einer Fragmentanalyse enthält.
- .0
- 15        17. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse enthält.
- 20        18. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Array eine Anzahl voneinander getrennter Zellen (Felder) aufweist und in mindestens einer Zelle des Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit dem gesuchten DNS-Abschnitt hybridisiert.
- 25
- 30        19. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des Oligonukleotids, das in der mindestens einen

Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.

20. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.  
5
21. Mikroarray, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen (Feldern), dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer Zelle des Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit einem DNS-Abschnitt hybridisiert, der Teil des menschlichen RhD-Gens ist.  
15
22. Mikroarray nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens sechs Zellen jeweils verschiedene Oligonukleotide angeordnet sind, die mit jeweils sechs verschiedenen DNS-Abschnitten des menschlichen RhD-Gens hybridisieren.  
20
23. Mikroarray nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Abschnitte Abschnitte  
25

der Kodierteilbereiche (Exons) 3, 4, 5, 6, 7 und/oder 9 sind.

24. Verfahren zur Bestimmung des Rhesusfaktors eines Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß die allelische Variabilität und/oder das Vorhandensein des RhD-Gen in einer Blutprobe erfaßt und daraus der Rhesus-Typ und/oder der Rhesus-Subtyp des Menschen bestimmt wird.  
5
25. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein eines oder mehrerer der Exons 4 bis 7 und/oder 9 des RhD-Gens erfaßt wird.  
10
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der allelischen Variabilität und/oder des Vorhandenseins des RhD-Gens mittels eines Mikroarrays nach einem der Ansprüche 18 bis 23 erfolgt.  
15
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung an einer Blutprobe der Person selbst erfolgt.  
20
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Rhesusfaktor eines Fötus bestimmt wird, indem eine maternale Blutprobe untersucht wird.  
25

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß aus der maternalen Blutprobe eine Fraktion abgetrennt wird, die im wesentlichen fötale, kernhaltige Erythrozyten enthält und der Rhesus-Faktor an dieser Fraktion bestimmt wird.  
5
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-haltigen Bestandteile der maternalen Blutprobe zuerst aufkonzentriert werden und anschließend diese Fraktion untersucht wird.  
.0
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile ein Blutsatz durchgeführt wird.  
15
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile eine Lyse darin enthalter nukleierter foetaler Erythrozyten durchgeführt und anschließend die zellfrei vorliegende DNS abzentrifugiert und für die weitere Diagnose gewonnen wird.  
20
33. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung des Rhesus-Faktors des Fötus die zellfreie fötale DNS im Blutplasma der maternalen Blutprobe untersucht wird.  
25

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 33,  
dadurch gekennzeichnet, daß aus der Blutprobe  
oder der Fraktion die DNS isoliert und zumindest  
teilweise vervielfältigt wird und anschließend  
5. die allelische Variabilität bzw. das Vorhanden-  
sein oder Fehlens des RhD-Gens bestimmt wird.
35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-  
durch gekennzeichnet, daß die DNS durch Polyme-  
rase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird.  
.0
36. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ver-  
vielfältigte DNS durch geeignete Restriktionsen-  
zyme verdaut und anhand der erzeugten DNS-Bruch-  
stücke die allelische Variabilität bzw. das Vor-  
handensein und/oder Fehler des RhD-Gens bestimmt  
15. wird.
20. 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 36,  
dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung  
der DNS eines oder mehrere Oligonukleotid-Paare  
verwendet werden, die die folgenden Sequenzen  
aufweisen:  
25. TCGGTGCTGATCTCAGTGGA und ACTGATGACCATCCTCATGT  
bzw.  
CACATGAACATGATGCACA und CAAACTGGGTATCGTTGCTG  
bzw.  
30. GTGGATGTTCTGCCAAGTT und CACCTTGCTGATCTTACC

bzw.

G T G G C T G G G C T G A T C T A C G und T G T C T A G T T C T T A C C G G C A A G T  
bzw.

A G C T C C A T C A T G G G C T A C A A und A T T G C C G G C T C C G A C G G T A T C  
5  
bzw.

A A C A G G T T G C T C C T A A A T A T T und A A A C T T G G T C A T C A A A A -  
T A T T A A C C T

38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeich-

0  
net, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz  
G T G G A T G T T C T G G C C A A G T T bzw. A G C T C C A T C A T G G G C T A C A A  
mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert  
sind.

15 39. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeich-

net, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz  
C A C A T G A A C A T G A T G C A C A bzw. A A C A G G T T G C T C C T A A A T A T T  
mit dem Fluorophor 4,7,2',4',5'7'-Hexachloro-6-  
Carboxyfluorescein markiert sind.

20 40. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeich-

net, daß die Oligonukleotide mit der Sequenz  
T C G G T G C T G A T C T C A G T G G A bzw. G T G G C T G G G C T G A T C T A C G  
mit dem Fluorophor NED™ der Fa. PE Biosystems  
markiert sind.

25 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 40,  
dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der am-  
plifizierten DNS die von der amplifizierten DNS  
abgegebenen Fluoreszenzstrahlung erfaßt wird.

5

42. Verwendung eines Verfahrens und/oder eines Diagnose-Kits nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur pränatalen Bestimmung des Rhesus-Faktors eines menschlichen Fötuses.

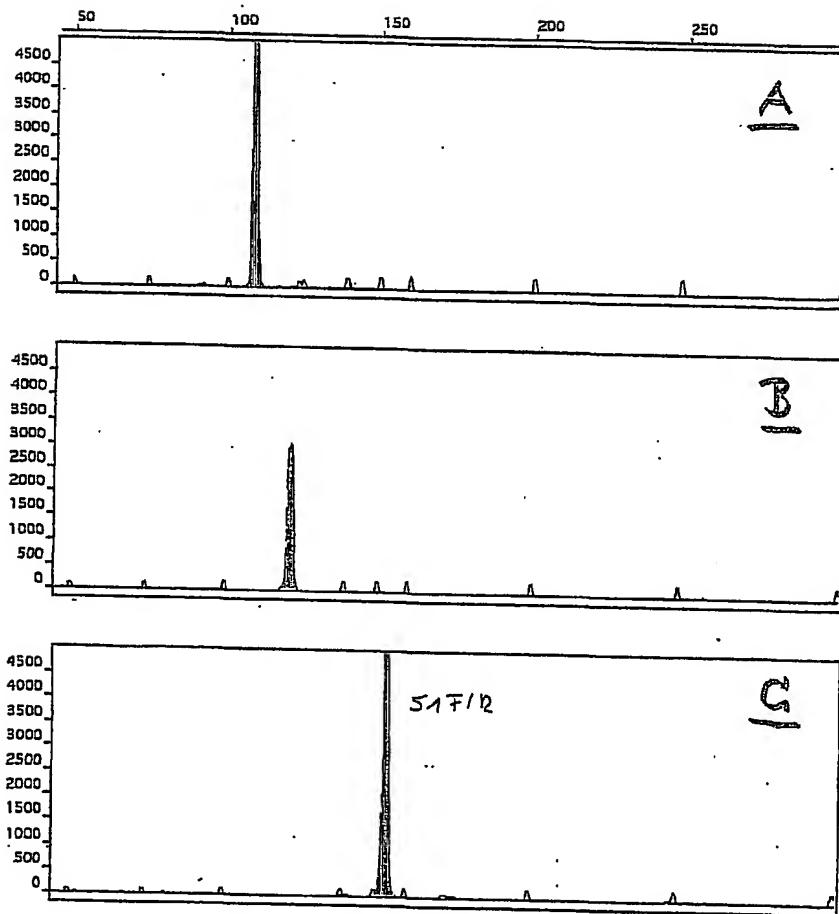


Fig. 1

2/5

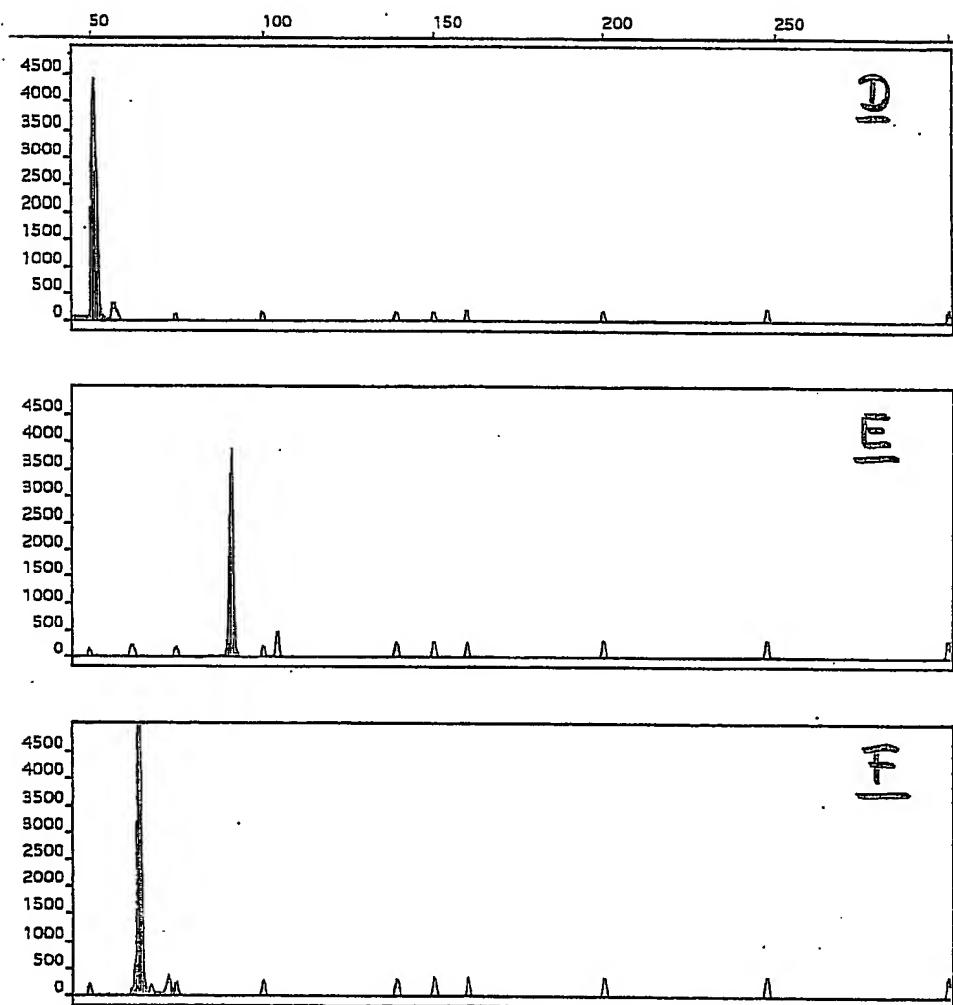


Fig. 1

3 / 5

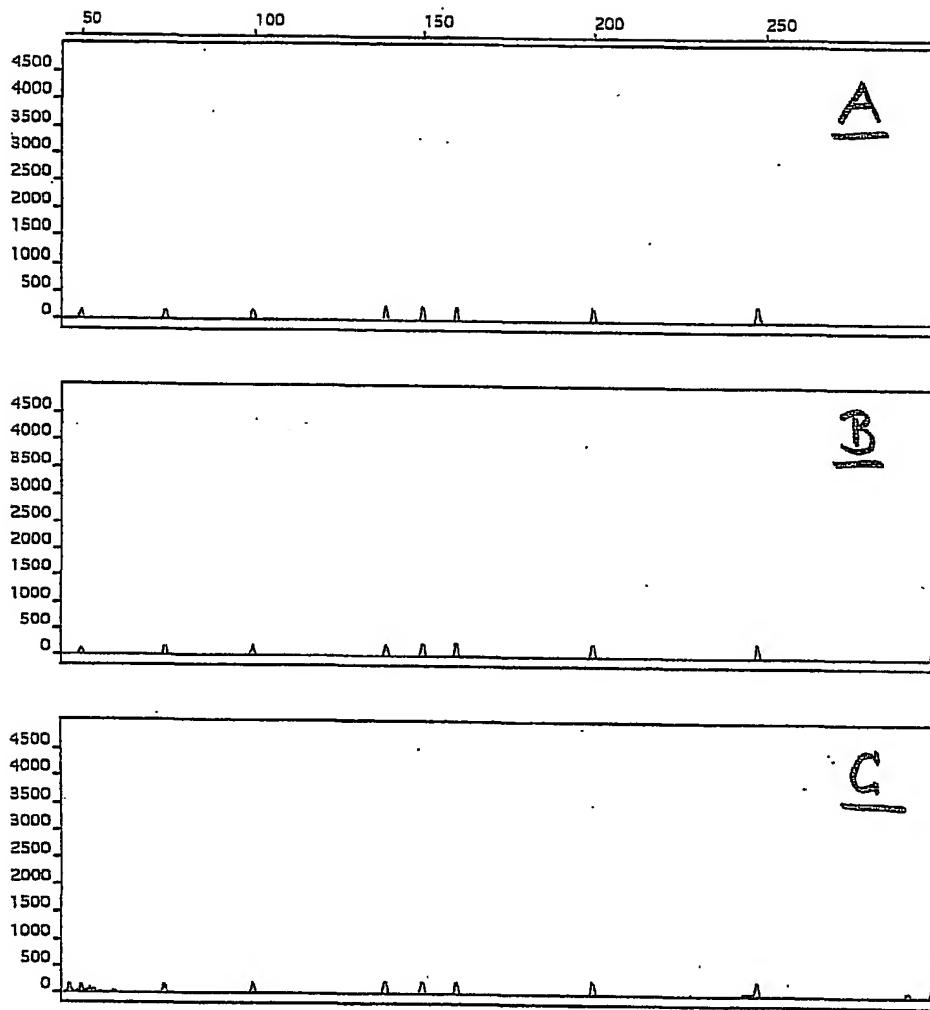


Fig: 2

4 / 5

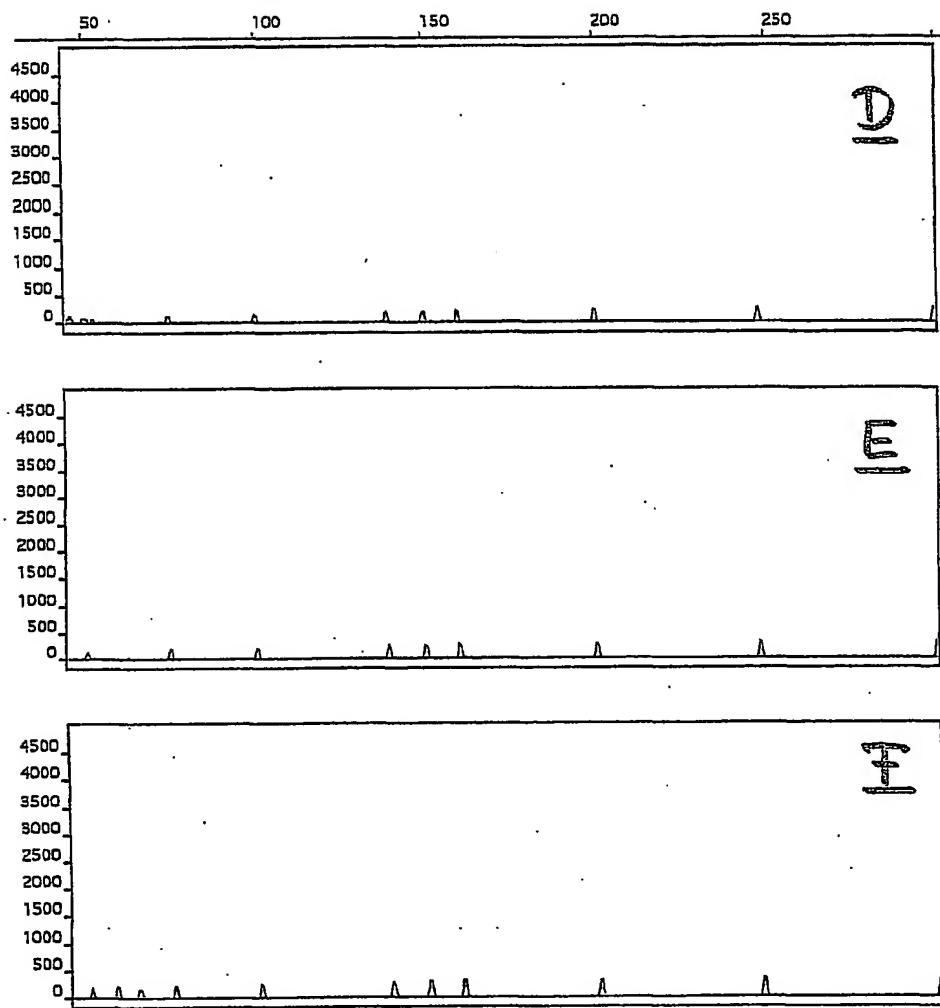


Fig. 2

5/5

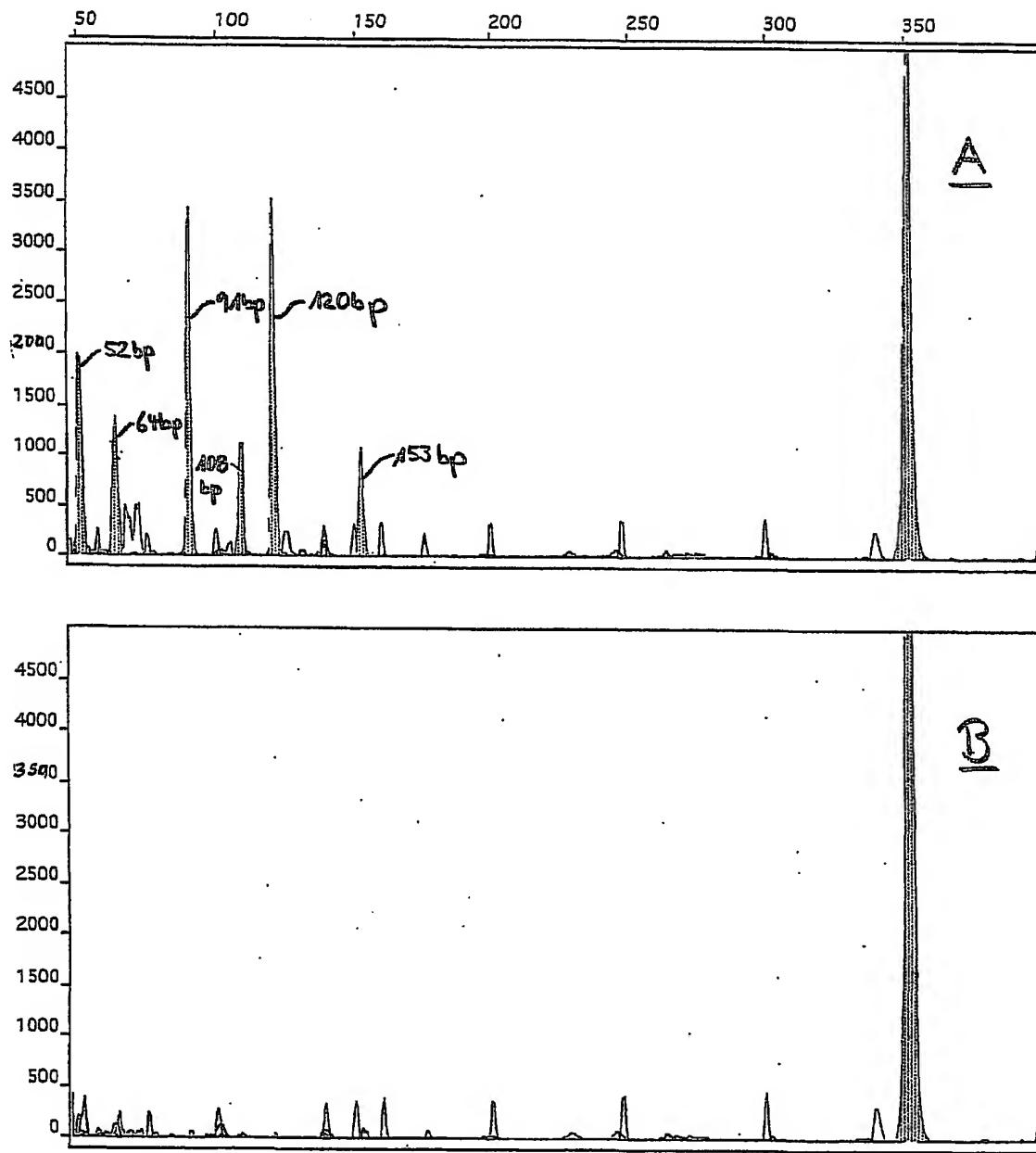


Fig. 3

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Adnagen AG

<120> Verfahren, Diagnose-Kit und Mikroarray zur Bestimmung  
des Rhesusfaktors

<130> PCT/EP

<140> PCT/EP

<141> 2001-03-20

<150> DE 10019553.9-41

<151> 2000-04-20

<150> DE 10049363.7-41

<151> 2000-10-05

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 1

tcggtgctga tctcagtgga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 2

actgatgacc atcctcatgt

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 3

cacatgaaca tgatgcaca

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 4

caaactgggt atcgttgctg

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 5

gtggatgttc tggccaagtt

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 6

cacccgttgctg atcttacc

18

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 7

gtggctgggc tgatctacg

19

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 8

tgtctagttt cttaccggca agt

23

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9

agctccatca tgggctacaa

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 10

attgccggct ccgacggtat c

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 11

aacaggtttg ctcctaaata tt

22

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 12

aaacttggtc atcaaaaatata ttaacct

27

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 13

gccctctgtc aacaagtcct ac

22

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 14

gccctaaaaaa gaaaatcgcc aatc

24